



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61R 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61R 47/48		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/04954 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Februar 2000 (03.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05145 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Juli 1999 (20.07.99) (30) Prioritätsdaten: 98113519.7 20. Juli 1998 (20.07.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D-81675 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D-81545 München (DE). MAG-DOLEN, Viktor [US/DE]; Moosacherweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). STÜRZEBECKER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, D-99094 Erfurt (DE). FOEKENS, John [NL/NL]; Filosofentuin 35, NL-2908 XA Capelle a/d IJssel (NL). LUTZ, Verena [DE/DE]; Sankt-Wolfgangs-Platz 9F, D-81669 München (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: NOVEL UROKINASE INHIBITORS (54) Bezeichnung: NEUE UROKINASE-INHIBITOREN (57) Abstract The invention relates to the use of derivatives of 3-amidino-phenyl-alanine as urokinase inhibitors for treating malignant tumors and the formation of metastases thereof. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue Urokinase-Inhibitoren

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidinophenylalanins als Urokinase-Inhibitoren insbesondere zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung bzw. als Mittel zum Targeting von Lymphzellen und zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere von Lymphomen.

10

Die Fähigkeit solider Tumoren zur Ausbreitung und Metastasierung in umgebendes Gewebe korreliert mit dem Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (Tumorstroma) in der Umgebung der Tumorzelle, bzw. mit deren Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran. Obwohl die (patho)biochemischen Zusammenhänge noch nicht endgültig aufgeklärt sind, kommen dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) und dem Urokinaserezeptor (uPAR) eine zentrale Bedeutung zu. uPA vermittelt die proteolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum ist eine Protease mit breitem Wirkspektrum, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und das Proteingerüst der Proteoglykane direkt abzubauen vermag. Außerdem kann Plasmin "latente" Metalloproteasen und das inaktive Proenzym von uPA, pro-uPA, aktivieren.

15

20

Tumorzellen und nichtmaligne Zellen des Tumorstromas synthetisieren und sezernieren das enzymatisch inaktive Proenzym pro-uPA. Proteasen wie z.B. Plasmin oder die Kathepsine B und L spalten pro-uPA durch limitierte Proteolyse zur aktiven Serinprotease HMW-uPA (HMW = high molecular weight). pro-uPA und die aktive Protease HMW-uPA binden an den Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Plasmin(ogen) bindet ebenfalls an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Tumorzelle, wodurch eine Fokussierung und Amplifikation der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der

30

- 2 -

Tumorzelle erreicht wird. Invasiven Zellen ist somit die Möglichkeit gegeben, die extrazelluläre Matrix abzubauen, ohne sich der für eine gerichtete Bewegung notwendigen Unterlagen durch Proteolyse zu entziehen.

5 In verschiedenen zellbiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß dem zellassozierten Plasminogenaktivator-System innerhalb der kaskadenartigen Reaktionswege tumorassoziierter Proteolysesysteme ein besonderer Stellenwert zukommt (Wilhelm et al. (1994) The Urokinase/Urokinase receptor system: A new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H., Kindermann G. (Hrsg): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier 10 1994, pp145-156). An Kulturen humaner Kolonkarzinomzellen wurde beobachtet, daß deren Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu durchwandern, vom Sättigungsgrad der uPA-Rezeptoren mit aktivem uPA 15 abhängig ist (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991), 3690-3695). Ebenfalls im Zellkulturmodell wurde eine Reduktion des invasiven Potentials von Zellen beobachtet, wenn die proteolytische Aktivität von uPA durch PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 6939-6943) oder PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990), 4676-4684) gehemmt wurde. Ein 20 vergleichbarer Effekt wurde bei Hemmung der Bindung von uPA an die Zelloberfläche durch Blockierung des Rezeptors mittels proteolytisch inaktiver uPA-Varianten erzielt (Cohen et al., Blood 78 (1991), 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993), 537-544). Auch die Transfektion epidermoider Karzinomzellen mit einem Plasmid, das ein Antisense- 25 Transkript gegen einen Teil von uPAR exprimiert, führte durch Unterdrückung der uPAR-Synthese zur Verringerung der Invasivität dieser Zellen (Kook, EMBO J. 13 (1994), 3983-3991). Gegen uPA und PAI-1 gerichtete Antikörper reduzierten das invasive Potential von Lungenkrebszellen in vitro (Liu et al., Int. J. Cancer 60 (1995), 501-506).

30

Der Einfluß des Plasminogenaktivator-Systems auf den Metastasierungsprozeß konnte auch in Tumor-Tiermodellen belegt werden. So wurden die

- 3 -

durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen in Hühnerembryos durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA fast vollständig verhindert (Ossowski und Reich, Cell 35 (1983), 611-619). Metastasierende menschliche Karzinomzellen wurden mit einem Ex-

5 pressionsplasmid transfiziert, das für eine proteolytisch inaktive, aber uPAR-bindende uPA-Mutante kodierte. Im Mausmodell zeigte sich, daß die Karzinomzellen, die inaktives uPA synthetisierten, nach Injektion im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Metastasen bildeten (Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 5021-

10 5025). Nach Verabreichung von uPA-Antisense Oligonukleotiden wurde darüber hinaus eine Inhibierung der intraperitonealen Ausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen beobachtet (Wilhelm et al., Clin. Exp. Metast. 13 (1995), 296-302).

15 In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht. Dabei erwies sich der uPA-Antigengehalt bei verschiedenen Tumoren (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Niere etc.) sowohl für das rezidivfreie Überleben

20 als auch für das Versterben als ein starker Prognosefaktor (siehe beispielsweise Schmitt et al., J. Obstet. Gynaecol. 21 (1995), 151-165; Jaenicke et al., Breast Cancer Res. Treat. 24 (1993), 195-208; Kuhn et al., Gynecol. Oncol. 55 (1994), 401-409; Nekarda et al., Lancet 343 (1994), 117; Pedersen et al., Cancer Res. 54 (1994), 4671-4675). Ebenso korrelieren erhöhte Konzentrationen an uPAR in Lungen- (Pedersen et al., supra) und

25 Brustkrebsgewebe (Duggan et al., Int. J. Cancer 61 (1995), 597-600; Ronne et al., Breast Cancer Res. Treat. 33 (1995), 199-207) sowie bei Magenkrebs sowohl im Tumorgewebe selbst (Heiss et al., J. Clin. Oncol. 13 (1995), 2084-2093) als auch bei den ins Knochenmark ausgestreuten

30 Tumorzellen (Heiss et al., Nature Medicine 1 (1995), 1035-1039) mit einer schlechten Prognose.

- 4 -

Der Einsatz von sythetischen uPA-Inhibitoren bietet die Möglichkeit, die Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Allerdings ist die Entwicklung spezifischer uPA-Inhibitoren mit Schwierigkeiten behaftet, da der Plasminogenaktivator von Gewebetyp (tPA) eine identische Spezifität für die Spaltung der Peptidbindung Arg560/Val561 von Plasminogen aufweist. In den meisten Fällen hemmen daher niedermolekulare uPA-Inhibitoren auch tPA und damit auch tPA-vermittelte Fibrinolyse. Außerdem muß gewährleistet sein, daß synthetische uPA Inhibitoren keine starke Hemmung von Plasmin zeigen.

10

Trotz dieser Einschränkungen sind einige Hemmstoffe bekannt, die eine gewisse Spezifität gegenüber uPA, jedoch geringe inhibitorische Kapazität besitzen, wie etwa Benzamidin- und β -Naphthamidin-Derivate, wobei die wirksamste Verbindung uPA mit $K_i = 2,2 \mu\text{mol/l}$ hemmt (Stürzebecher und Markwardt, Pharmazie 33 (1978), 599), oder Amilorid mit einem $K_i = 7 \mu\text{mol/l}$ (Vassalli und Belin, FEBS. Lett. 214 (1987), 187-191).

20

DE-A-30 35 086 offenbart Cyclohexancarbonsäurederivate, die inhibitorische Wirkungen auf Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin oder uPA haben. Die untersuchten Verbindungen zeigen jedoch nur eine recht geringe und darüber hinaus unspezifische uPA-Inhibierung. EP-A-O 183 271 offenbart Lysinderivate und deren Verwendung als Proteaseinhibitoren. Es wird auch ein Benzamidino-Lysinderivat (Verbindung 108) beschrieben, das in vitro eine uPA-Hemmung, jedoch auch eine vergleichbare Wirkung auf andere Proteasen wie Trypsin oder Plasma-Kallikrein aufweist. WO 95/17885 offenbart niedermolekulare Polypeptide als uPA-Inhibitoren.

25

Eine weitere Klasse von bekannten uPA-Inhibitoren stellen 4-substituierte Benzothiophen-2-carboxamidine mit einem $K_i = 0,16 \text{ mmol/l}$ im Falle von Benzothiophen-623 dar (Towle et al., Cancer Res. 53 (1993), 2553-2559). Diese Hemmstoffe haben eine signifikant höhere Affinität für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin. Auch uPAR-gebundenes uPA wird mit hoher

30

- 5 -

Effizienz gehemmt. Ein Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, daß die chemische Synthese kompliziert ist und kaum Möglichkeiten für die Modifizierung der Struktur vorhanden sind, bzw. bisher gezeigt werden konnte.

- 5 Die Entwicklung weiterer Hemmstoffe von uPA ist daher für die weitere Aufklärung der Rolle von uPA und uPAR bei verschiedenen Krankheiten, speziell bei der Tumorausbreitung und Metastasierung, von großem Nutzen.

N-Arylsulfonyl- und *N*-Arylsulfonyl-amino-acyl-Derivate des 3-Amidinophenylalanins sind als selektive Hemmstoffe von Thrombin (Markwardt et al., Thromb. Res. 17 (1980), 425-431) bzw. von Gerinnungsfaktor Xa (Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54 (1989), 245-252) bekannt. Auch in WO 92/08709, WO 94/18185 und WO 96/05189 wird die Verwendung von Amidinophenylalaninderivaten als Hemmstoffe für die Blutgerinnung, insbesondere als Hemmstoffe für Thrombin, offenbart.

Intensiv wurden Piperidide und Piperazine des 3-Amidinophenylalanins untersucht, unter denen auch Leitstrukturen zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme gefunden wurden (Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhibition 9,87-99, 1995; Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40, 3091-3099, 1997). Während bei Stürzebecher et al. (1995) nur eine Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Trypsin beschrieben ist, finden sich bei Stürzebecher et al. (1997) auch Angaben zur Hemmung von uPA. Bei *N*-2-Naphthylsulfonyl-, *N*-2-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl)sulfonyl- und *N*-2-Campher-10-yl-sulfonyl-substituierten 3-Amidinophenylalaninpiperaziden wird für uPA ein K_i -Wert von 28 bis 140 $\mu\text{mol/l}$ gefunden, der um drei Größenordnungen höher als die Inhibitionskonstante für Thrombin ist. Somit konnte nicht davon ausgegangen werden, daß 3-Amidinophenylalaninderivate als Urokinaseinhibitoren geeignet sind.

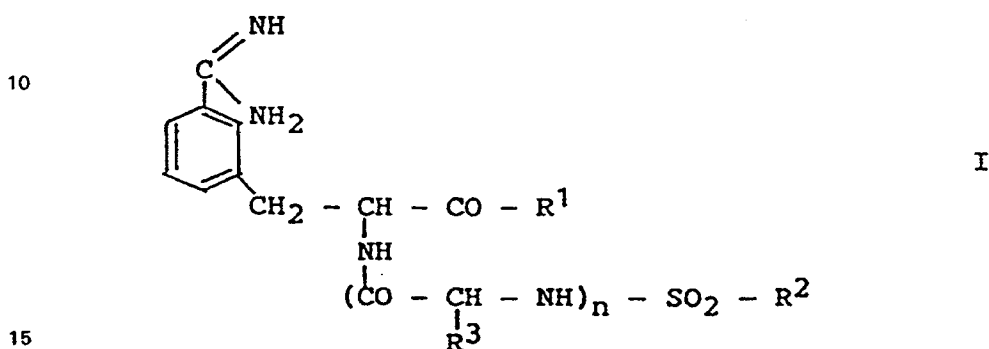
30

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß an Position 2 mit einem Phenylrest substituierte 3-Amidinophenylalaninderivate selektive und in vivo

- 6 -

wirksame Hemmstoffe von uPA darstellen. Weiterhin wurde gefunden, daß diese Substanzen eine hohe Selektivität für Lymphgewebe aufweisen und sich daher als Mittel zum Targeting von Lymphzellen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Erkrankungen des Lymphgewebes wie etwa Lymphomen eignen.

Die vorliegende Erfindung betrifft von 3-Amidinphenylalanin abgeleitete neue Urokinase-Inhibitoren der allgemeinen Formel I,



die als Racemate sowie als L- bzw. D-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

R1 (a) OH oder OR⁴ ist, wobei R⁴ ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituirtes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₈-Alkyl, C₃-C₈-Cycloalkyl oder Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel $\begin{array}{c} \text{R}^5 \\ \diagup \\ \text{-N} \\ \diagdown \\ \text{R}^6 \end{array}$ darstellt, in welcher R⁵ und

R⁶ beliebige mit der Gesamtstruktur kompatible Reste sind, wobei insbesondere

(i) R⁵ und R⁶ H sind,

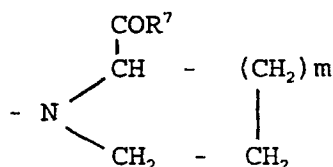
(ii) R⁵ H ist und R⁶ ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituirtes verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₈-

- 7 -

Alkyl, Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, oder C₅-C₈ Cycloalkyl ist,

- (iii) R⁵ und R⁶ jeweils unabhängig ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C₁-C₄ Alkyl sind oder
- (iv) R⁵ H ist und R⁶ -NH₂ oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,
- (v) R⁵ H oder ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C₁-C₄ Alkyl ist und R⁶ der Rest einer Aminosäure, z.B. einer α-, β- oder ω-Aminocarbon- oder Aminosulfonsäure, oder der Rest eines Peptids z.B. mit einer Länge bis zu 50 Aminosäuren oder eines Polypeptids z.B. mit einer Länge von mehr als 50 Aminosäuren bis 1000 Aminosäuren ist,

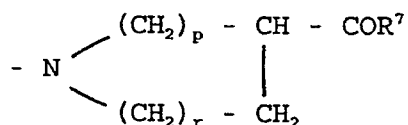
(c) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C₁-C₄-Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R⁷ die Bedeutung von R¹ in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

- 8 -

(d) eine Gruppe der Formel

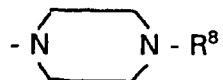


darstellt, in welcher $p = r = 1$, $p = 1$ und $r = 2$ oder $p = 2$ und $r = 1$ sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C_1 - C_4 -Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, und R^7 die Bedeutung von R^1 in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist,

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 z.B. mit einem C_1 - C_4 -Alkyl-, C_1 - C_3 -Alkoxy- oder Hydroxylrest substituiert ist,

wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring, vorzugsweise Phenyl oder Cyclohexyl, in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ancondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher R^8

- (i) einen gegebenenfalls z.B. mit C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_3 -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten C_1 - C_6 -Alkyl- oder Arylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Naphthyl,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten C_1 - C_6 -Alkoxyrest oder

- 9 -

- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₃-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenoxy- bzw. Benzylloxycarbonylrest bedeutet,

5

- (g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

- (i) H, einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten, unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, vorzugsweise einen C₁-C₆-Alkylrest, insbesondere Methyl,

10

- (ii) einen gegebenenfalls z.B. mit C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₃-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Thienyl oder

15

- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Cycloalkylrest, vorzugsweise einen C₃-C₁₀-Cycloalkylrest bedeutet,

20

- (h) einen Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls z.B. mit einem Halogenatom, einer C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₃-Alkoxy-, Hydroxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonyl- oder Nitrogruppe substituiert ist,

25

- (i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R", einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R" oder einen Essigsäureamidrest -CH₂-CONR'R" darstellt, wobei

- (i) R' und R" H sind,
(ii) R' und R" jeweils unabhängig C₁-C₄-Alkyl sind,
(iii) R' H ist und R" C₁-C₄-Alkyl ist,
(iv) R' H ist und R" Aryl, z.B. Phenyl, ist oder

30

- 10 -

- (v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom z.B. N, O oder/und S tragen kann, bilden,
- 5 (j) einen SO₂-Y-Rest darstellt, in dem Y
- (i) ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes C₁-C₈-Alkyl, vorzugsweise Methyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl,
- 10 (ii) ein gegebenenfalls z.B. mit C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₃-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes Aryl oder Heteroaryl, wie z.B. Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-
- 15 Trimethyl-phenyl, 2,2-Dimethyl-6-methoxy-chromanyl, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chromanyl, Anthrachinonyl, Naphthyl oder Chinolyl, bzw. O-Aryl, vorzugsweise O-Phenyl, oder O-Heteroaryl oder
- (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder
- 20 C₁-C₃-Alkyl bedeuten,
- (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der ggf. z.B. mit einer C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₃-Alkoxy-, Halogen-, Hydroxyl- oder/und Oxogruppe substituiert ist,
- 25 (l) einen gegebenenfalls z.B. mit C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₃-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Heteroarylrest, wie z.B. Pyridyl oder Pyrimidyl, oder heterocycloaliphatischen Rest, beispielsweise
- 30 N-Methylpiperidyl darstellt,

- 11 -

(m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel $-(CH_2)_n-X$ darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist, $n = 1$ bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X

(i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine C_1-C_4 -Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, z.B. Phenyl, C_1-C_4 -Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl, (C_1-C_6) , substituiert ist,

(ii) ein Halogenatom bedeutet,

(iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel $-N(Alk)_2$ darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome sowie vorzugsweise die gleiche Bedeutung besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, z.B. N, O oder/und S tragen kann, angehört,

R^2 einen gegebenenfalls z.B. mit C_1-C_6 -Alkyl, C_1-C_3 -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenylrest, wie beispielsweise Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl darstellt,

R^3 H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes C_1-C_4 -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

Die Verbindungen können auch als Salze vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride, oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen.

Von den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Verbindungen sind solche, bei denen R^1 einer Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) entspricht, R^2

einen einfach, zweifach oder dreifach alkylsubstituierten Phenylrest, insbesondere einen 2,4,6-substituierten Phenylrest, z.B. einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt und $n = 0$ ist, von besonderer Bedeutung.

- 5 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie z.B. in WO 92/08709 und WO 94/18185 beschrieben, hergestellt und auf ihre biologische in vitro Aktivität gesetzt werden.

- (L)-, (D)- oder (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid wird mit
10 einem entsprechenden Sulfochlorid oder einer sulfonylierten Aminosäure bzw. deren Halogenid in Gegenwart einer Base zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I mit Cyanfunktion, in der $R^1 = OCH_3$ ist und R^2 sowie R^3 und n den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Bedeutungen entspricht, umgesetzt. Durch milde saure oder alkalische Hydrolyse sind
15 daraus die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Carbonsäurestruktur ($R^1 = -OH$) erhältlich, deren Veresterung mit einem entsprechenden Alkohol unter säurekatalytischen Bedingungen zu Verbindungen der allgemeinen Formel I führt, wobei $R^1 = (a)$ bedeutet. Nach einem in der Peptidchemie üblichen Verfahren, z.B. DCC-Verfahren in Gegenwart von HOBt, sind durch
20 Umsetzung der Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ($R^1 = -OH$) mit einem Nukleophil der Strukturen (b), (e) und (f) die Verbindungen mit entsprechendem R^1 der allgemeinen Formel I vorstellbar. Für die Synthese von Verbindungen mit $R^1 = (c)$ und (d) werden zunächst die Carbonsäuren der allgemeinen Formel I mit $R^1 = OH$ mit cycloaliphatischen Aminosäureestern der Strukturen (c) und (d), wobei R^7 vorzugsweise $-OCH_3$ bzw. $-OC_2H_5$
25 bedeutet, umgesetzt, die erhaltenen Carbonsäureester unter milden sauren oder alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert, die nachfolgend in bereits beschriebener Weise verestert oder mit Nukleophilen der Struktur (b), (e) und (f) umgesetzt werden können,
30 wobei Verbindungen der allgemeinen Formel I mit $R^1 = (c)$ sowie (d) und $R^7 = (a)$, (b), (e) und (f) erhalten werden.

- 13 -

Die Zielverbindungen der allgemeinen Formel I mit Amidinstruktur sind aus den Cyanverbindungen in bekannter Weise erhältlich, wobei in der Regel durch Addition von H₂S an die Cyangruppe zunächst die Thioamide erhalten werden, die durch S-Methylierung mit Methyljodid in die Thioimidoester und
5 anschließend durch Behandlung mit Ammoniumacetat in alkoholischer Lösung in die Amidinoverbindungen überführt werden. Außerdem können gegebenenfalls aus den Cyanverbindungen mit Methanol oder Ethanol in Gegenwart von HCl-Gas und in bestimmten Fällen eines inerten Lösungsmittels die entsprechenden Imidoesterhydrochloride dargestellt werden, deren Umsetzung in alkoholischer Ammoniaklösung zu den Amidinoverbindungen führt.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit mindestens einem geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder
15 Trägerstoff zur Herstellung von oral, subkutan oder intravenös verabreichbaren Arzneimitteln zur Tumorbekämpfung oder in der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls möglich ist die Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden.

20

Die Arzneimittel zur Tumorbekämpfung bei Menschen und Tieren können topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

25

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung der Formel (I) um N α -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid bzw. um das L-Entantiomere davon oder um ein pharmazeutisch verträgliches Salz dieser Verbindungen. Diese
30 Substanzen haben ein gutes Löslichkeitsverhalten. In Trispuffer (pH 7,3) sind sie bis zu einer Konzentration von 5×10^{-5} mol/l löslich. Durch Zusatz

- 14 -

von 5% Ethanol steigt die Löslichkeit auf 2×10^{-4} mol/l und bei Zusatz von 5% DMSO auf 10^{-3} mol/l.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung von malignen Tumoren zu hemmen, z.B. die Tumorausbreitung beim Pankreaskarzinom, das Tumörwachstum des Mammakarzinoms sowie die Metastasierung von Tumoren. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Antitumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam (z.B. bei der Verhinderung der Blasenbildung bei der Hauterkrankung Pemphigus vulgaris).

Erfindungsgemäße uPA Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10-fach geringeren K_i -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin und Faktor Xa zu hohe K_i -Werte haben.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der Formel I können in Form von Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z.B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z.B. Chemotherapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-Uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägers vesikeln, z.B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den Trägers vesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z.B. zytotoxischen Mitteln wie etwa Doxorubicin ermöglichen.

- 15 -

Eine weitere Indikation für die Substanzen der allgemeinen Formel II:



5 worin X einen beliebigen Rest, insbesondere einen organischen Rest darstellt, z.B. einen Rest wie für Verbindungen der Formel I definiert, aber auch einen anderen Rest, z.B. eine physiologisch wirksame Substanz wie etwa ein zytotoxisches Mittel, ein Peptid oder eine Radiomarkierung, ein Lipid oder ein Kohlenhydrat bedeutet, und R² eine Gruppe wie zuvor
10 definiert bedeutet, insbesondere einen 2,4,6-dreifach substituierten Phenylrest, z.B. 2,4,6-Triisopropylphenyl, ist das Targeting von Lymphzellen, welches aufgrund ihrer um den Faktor 10 bis 20 höheren Affinität für Lymphknotengewebe gegenüber anderen Gewebetypen möglich wird. Vorzugsweise ist R² über eine Sulfonylgruppe -SO₂- mit dem Rest X
15 verbunden. Somit eignen sich diese Substanzen hervorragend als Mittel zur Diagnostik oder zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere malignen Erkrankungen wie etwa Tumormetastasen und Lymphomen. Die Verabreichung der Substanzen kann wie zuvor bereits beschrieben erfolgen. Eine Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes erfolgt vorzugsweise durch eine mehrtägige Verabreichung des
20 Medikaments, z.B. über einen Zeitraum von 5 bis 20 Tagen, mit einer anschließenden Behandlungspause und gegebenenfalls ein oder mehrmaligem Wiederholen der Applikation.

25 Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1 das Ergebnis einer Zytotoxizitätsbestimmung einer erfindungsgemäßen Substanz,

30

Figur 2 das Ergebnis eines Versuchs zur Inhibierung des Abbaus einer Fibrinmatrix durch humane Mammakarzinomzellen,

- 16 -

Figuren 3

und 4 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf die Ausbreitung, das Wachstum und die Metastasierung von Mammarkarzinomzellen in der Ratte,

5

Figur 5 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstums eine Pankreastumors in der Ratte und

Figur 6 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstum humaner Mammarkarzinomzellen in Mäusen.

10

Beispiele

1. **α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid**

15

1.1 **α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-methylester**

20 5 g (L)-3-Cyanphenylalanin-methylester wurden in 100 ml Dioxan suspendiert, 4,45 ml N-Methylmorpholin (NMM) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5,97 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid in fester Form wurde 3 Tage gerührt, danach ausgefallenes NMM-HCl abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene

25 Rohprodukt über Kieselgel (KG) 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 8,34 g Sirup (90%).

1.2 **α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin**

30 8,34 g der Verbindung 1.1 wurden in einer Mischung aus je 50 ml Essigsäure und 1 N Salzsäure 8 Std. unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten 2x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Ethylacetatlö-

- 17 -

sungen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach Reinigung über KG 60 (Chloroform) wurden 5,8 g eines festen Produktes erhalten (72%).

5 **1.3 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid**

5,7 g der Verbindung 1.2 wurden in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf 0°C abgekühlt, 2,22 g α -Hydroxybenzotriazol (HOBt),
10 2,82 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 3,94 g 1-Ethoxycarbonyl-piperazin in 30 ml THF wurde über Nacht gerührt, danach ausgefallenes Dicyclohexylurea (DCU) abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über KG 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 7,1 g eines
15 amorphen Pulvers (96%).

1.4 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid Hydrochlorid

20 7,1 g der Verbindung 1.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen Triethanolamin (TEA) zugefügt, 10 min ein kräftiger Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst, die organische Phase mit 1 N
25 Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. 7,2 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 250 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 17 g Methyljodid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das
30 Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydroiodid (8,5 g) in 50 ml Methanol gelöst, 1,9 g Ammoniumacetat zugefügt und der Ansatz 4 Std. bei 60°C erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels

- 18 -

erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Das auf diese Weise erhaltene Amidin-hydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 5,3 g eines amorphen Pulvers (69%).

5

2. α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidinopenyl-alanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid

2.1 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-ethylester

10

4,56 g α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanin (aus (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid und dem entsprechenden Sulfochlorid analog 1.1 und 1.2 dargestellt), 1,5 g HOBt und 2,42 g DCC wurden in 50 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt und danach 2,36 g Nipecotinsäure-ethylester zugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde ausgefallenes DCU abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und zur Kristallisation stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,46 g (75%).

15

20

2.2 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure

25

4,4 g des vorher beschriebenen Ethylesters wurden in einer Mischung aus 35 ml Essigsäure und 25 ml 1 N HCl 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde zum Erkalten stehengelassen, wobei sich ein wachsartiges Produkt abschied. Nach Abgießen des Lösungsmittels wurden 200 ml Wasser zugesetzt, längere Zeit kräftig gerührt und die erhaltene feste Substanz

30

- 19 -

abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 3,84 g (92%).

5 **2.3 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid**

2,28 g der vorher beschriebenen Verbindung 0,6 g HOBt und 0,97 g DCC wurden in 20 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt, anschließend 0,6 g Benzylamin zugefügt und weiter über Nacht gerührt. Nach
10 Abfiltrieren des ausgefallenen DCU wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Methanol gelöst und die Lösung in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung/Eis gegossen. Nach 1 Std. wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,48 g (94%).

15

2.4 α -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidino-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid

2,4 g der Verbindung 2.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen
20 TEA zugefügt, in die Lösung 10 min Schwefelwasserstoff eingeleitet und der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter Kochsalzlösung und
25 Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. 2,38 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 100 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 6,5 g Methyljodid versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidonester-hydroiodid in 50
30 ml Methanol gelöst, 0,5 g Ammoniumacetat zugegeben und der Ansatz 4 Std. bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über KG

- 20 -

60 gereinigt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, danach mit Chloroform/Methanol 9:1. Das so gereinigte Amidinhydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 1,45 g eines amorphen Pulvers (56%).

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch, eine Reinheitsprüfung erfolgte mittels DC und HPLC.

3. In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

Konfiguration	R ¹	R ²	n	K _i , $\mu\text{mol/l}$
L	-N N-COOC ₂ H ₅	TIPP	0	0,41
D,L	-N N-COOC ₂ H ₅	TIPP	0	0,96

Abkürzungen: TIPP - 2,4,6-Triisopropylphenyl

Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 200 μl Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol pH 8,0), 25 μl Substrat (Pefachrome UK oder Bz- β Ala-Gly-Arg-pNA in H₂O; Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz) und 50 μl sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K_i-Werte wurden nach Dixon durch lineare

- 21 -

Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i -Werte sind das Mittel aus mindestens 3 Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%.

- 5 4. In vitro Hemmung verschiedener Serinproteasen vom Trypsin-Typ durch ($N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (uPA-Inhibitor) und $N\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-N'-methylpiperazid (Naphthylsulfonyl-Derivat) als Vergleich

10

15

20

Enzym	K _i [μmol/l]	
	uPA-Inh.	Naphthylsulfonyl-Der.
Urokinase	0,41	150
Plasmin	0,39	55
Sc-tPA	4,9	430
Thrombin	0,49	0,036
Faktor Xa	1,7	30
Faktor XIIa	13	> 1000
Plasma-Kallikrein	7,2	85
Glandulär-Kallikrein	> 1000	> 1000
Trypsin	0,037	1,3
Tryptase	6,3	33

Die Bestimmung der Hemmwirkung für die verwendeten Enzyme erfolgte nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Prinzip.

25

Aus den oben angegebenen Werten ist ersichtlich, daß der erfindungsgemäße Urokinasehemmstoff uPA-Inhibitor überraschenderweise einen um mehr als den Faktor 10 kleineren K_i -Wert für Urokinase als für Einzelketten tPA (Sc-tPA) aufweist. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen als selektive Urokinaseinhibitoren. Zum Vergleich ist die Inhibitor-

30

- 22 -

aktivität des Naphthylsulfonyl-Derivats angeführt, das eine signifikant geringere in vitro Anti-uPA-Aktivität aufweist.

5. Bestimmung der Zytotoxizität

5

Für die Bestimmung der Zellproliferation/Zytotoxizität wurde ein kommerziell erhältlicher Test eingesetzt (Promega), welcher auf der zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes beruht. Das aus dieser Reaktion resultierende farbige Produkt kann mittels eines ELISA-Spektrometers (ICN-Flow) quantifiziert werden. Der synthetische Inhibitor (offene Kreise) hatte gegenüber dem Lösungsmittel (geschlossene Kreise) alleine keinen Einfluß auf das Zellwachstum humaner Orvariakarzinomzellen OV-MZ-6 (Figur 1). Somit ist der erfindungsgemäße uPA-Inhibitor in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bis 40 μ M nicht zytotoxisch.

15

6. Inhibierung des Abbaus einer Fibrin-Matrix durch humane Mammakarzinomzellen

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen eine extrazelluläre Matrix abzubauen, wurde ein Fibrinmatrixabbau-Test entwickelt und verwendet. Je größer die proteolytische Aktivität der Tumorzellen, um so höher ist die Konzentration der Fibrinabbauprodukte im Matrixüberstand. Der Matrixabbaukapazität entspricht der Konzentration der Fibrinabbauprodukte, welche mittels ELISA (D-Dimer) ermittelt werden.

25

Die Fibringlele wurden in 24 Well Kulturplatten aus 200 ml Fibrinogen (50 mg/ml) in PBS (pH 7,4) durch 50 μ l Thrombin (10 U/ml) und 50 μ l CaCl_2 (150 mM) pro Well nach Inkubation für 30 min bei 37°C gebildet. 2×10^5 Mammakarzinomzellen wurden auf diese Fibrinmatrix in 1 ml DMEM Kulturmedium, plus 10% fetalem Kälberserum und 2 μ g Glu-Plasminogen ausgesät und 4 h lang inkubiert. Danach wurde der Überstand zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und die Fibrinabbauprodukte mittels ELISA

30

- 23 -

quantifiziert. Die Zugabe des erfindungsgemäßen Inhibitors (A) in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Inhibierung des Matrixabbaus durch Mammakarzinomzellen im Vergleich zu dem Naphthyl-Derivat (B), das keine Hemmung des Fibrinabbaus durch Mammakarzinomzellen zeigt (Figur 2).

7. In vivo Test des uPA Inhibitors auf Tumorausbreitung, Tumorwachstum und Metastasierung in der Ratte

10 A) Brustkrebs-Modell

10-25 mm³ Rattenbrustkrebs-Tumorfragmente BN-472 wurden subkutan orthotropisch unter die Fettpolster der Brustdrüse in 6 bis 7 Wochen alten, weiblichen Brown Norwegian Ratten transplantiert (Tag 0). Die Behandlung der Tiere wurde 24 h nach der Tumorinokulation intraperitoneal begonnen. Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt nur Injektionslösung (100 µl einer 10% Ethanol/Saline (0,9% NaCl) Lösung). Der Vergleichsgruppe des Naphthyl-Derivats (B) und der Therapiegruppe des erfindungsgemäßen uPA-Inhibitors (A) wurden in der oben genannten Lösung eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

Die Abmessungen der subkutanen Tumoren und die Gewichte der Tiere wurden wöchentlich bestimmt. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und Tumorgewichte, Organgewichte und die Anzahl von Metastasen in relevanten Geweben bestimmt.

Die Behandlung mit uPA-Inhibitor (A) führte zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes sowie der axillären Lymphknoten ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,005$) im Vergleich mit dem Naphthyl-Derivat (B) und Kontrollgruppen ohne Inhibitor (Fig. 3 und 4). Die Gewichte

- 24 -

von Lunge, Leber, Niere und Milz bei den mit dem uPA-Inhibitor behandelten Tieren waren unverändert gegenüber den Kontrolltieren.

B) Pankreaskarzinom-Modell

5

Fragmente des transplantierbaren und metastasierenden Pankreasadenokarzinoms CA20948 der Ratte wurden aus Donortieren explantiert. Nach Zellvereinzellung wurden gleiche Mengen an suspendierten Tumorzellen zusammen mit 2 mg Matrigel jedem der
10 Empfängertiere, männlichen 10 Wochen alten Lewisratten (n = 9), subkutan implantiert. Die Durchführung der Behandlung sowie Zusammensetzung der Therapiegruppen war identisch wie unter A).

Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, findet man beim erfindungsgemäßen uPA-Inhibitor (offene Kreise) gegenüber dem Naphthyl-Derivat (geschlossene Kreise) und der Kontrollgruppe (Dreiecke) eine signifikante
15 Verringerung des Tumorgewichts und eine Verminderung des Wachstums bei den entstehenden Ratten-Pankreaskarzinom.

20 C) Wiederholung der Versuche mit geänderter Applikationsart

Die in den Abschnitten A und B beschriebenen Versuche wurden mit geänderter Applikationsart des Inhibitors wiederholt. Dabei wurde ohne Veränderung der täglichen Dosis der Inhibitor im Mammakarzinom-Modell subkutan (n = 9) und im Pankreasadenokarzinom-Modell
25 intraperitoneal (n = 8) appliziert. Die Ergebnisse dieser Wiederholungsversuche entsprachen in Tendenz und Umfang den bereits dargestellten Ergebnissen.

30

- 25 -

D) Zusammenfassung der Ergebnisse

In allen Versuchen wurde durch Behandlung mit dem Inhibitor eine erhebliche Reduktion der TumorgroÙe bzw. des Tumorgewichts und der Anzahl bzw. der Masse von Tochtergeschwülsten im Vergleich zu den Kontrollgruppen erreicht. Im Mammatumor-Modell waren in der Inhibitor-behandelten Gruppe, die mittleren Tumorgewichte am Ende der Behandlung auf 23% (i.p.) bzw. 37% (auf s.c.) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle reduziert. Die Anzahl der Lungenfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen waren auf 9% (i.p.) bzw. 32% (s.c.) und die mittleren Gewichte der axillären Lymphknoten auf 27% (i.p.) bzw. 48% (s.c.) reduziert.

Im Pankreastumor-Modell waren die Massen des tumorhaltigen Pankreas in den Inhibitor-behandelten Gruppen um 76% (i.p.) bzw. 34% (s.c.), die Massen der subkutanen Tumoren um 54% (i.p.) bzw. 60% (s.c.) verglichen mit den jeweiligen Vehikel-behandelten Gruppen reduziert. Die Anzahl detektierter Leberfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen war 29% (i.p.), bzw. 2% (s.c.) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen.

Die Entwicklung der Körpergewichtszunahme und der Vergleich der Organgewichte zwischen Inhibitor- und Vehikel-behandelten Gruppen lieÙen keine Hinweise für eine etwaige erhebliche Toxizität des Inhibitors unter den beschriebenen Bedingungen erkennen.

8. Behandlung humaner Brustkrebszellen in der Nacktmaus

Um die in vivo Effizienz des Inhibitors zur Hemmung des Tumorwachstums humaner Mammakarzinomzellen zu testen (MDA-BA-231), wurden 6×10^6 Zellen subcutan in die rechte Flanke von Balb/c Nacktmäusen (4-6 Wochen alt) injiziert. Die Tumorzellen wurden vor Inokulation mit dem synthetischen

- 26 -

uPA-Inhibitor vorinkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal wie unter A) beschrieben zweimal wöchentlich behandelt. Die Tumorgroße wurde wöchentlich durch Messung der zwei größten Durchmesser bestimmt.

5

Wie aus Figur 6 ersichtlich ist, nimmt das Tumolvolumen bei der Verabreichung des uPA-Inhibitors (offene Kreise) signifikant langsamer zu als in der Kontrollgruppe (geschlossene Kreise) wo Ethanol in Saline verabreicht wurde.

10

9. Die Biodistribution des Inhibitors in der Ratte

Die Biodistribution des Inhibitors wurde in zwei unabhängigen Versuchen in Gewebeaufschlüssen von Ratten ermittelt, die 5 bzw. 10 Tage lang täglich einmal mit 1 mg/kg Inhibitor i.p. behandelt worden waren. Zum Aufschluß wurden jeweils 100 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und mit 200 μ l 1 % Triton X-100 in physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Nach Zugabe von 400 μ l Ethanol wurde der Aufschluß 1 min mit Ultraschall behandelt. Der Gewebeextrakt wurde 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur Vorreinigung wurde der Überstand auf eine mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasserequilibrierte C18-Silica Reversed Phase Vorsäule (Sep-Pak® cartridge C18, 1 ml Waters, Eschborn, Deutschland) aufgetragen, hintereinander mit 2 x 1 ml H₂O, 1 ml 10% Methanol, 1 ml H₂O, 1 ml 5% Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure und 1 ml H₂O gewaschen und mit 500 μ l 75 % Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure eluiert. Die HPLC-Analytik wurde auf einer Reversed Phase C18 Silica Säule mit einem 5-55%igen Acetonitril Gradienten mit 0,04% Perchlorsäure durchgeführt.

Die Konzentrationen des Inhibitors in den jeweils untersuchten Gewebetypen (μ g/g) sowie in Blutplasma und Galle (μ g/ml) und zum Vergleich eines entsprechenden Naphthylsulfonylderivats sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

30

Tabelle

Verteilungsprofil einer erfindungsgemäßen Substanz in verschiedenen Geweben bzw. Blutplasma und Galle im Vergleich zu einem Naphthylsulfonyl-Derivat (α -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid)

Gewebe	Gehalt ($\mu\text{g/g}$)		
	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 5 Tage	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 10 Tage	Naphthylsulfonyl- Derivat 1 mg/kg i.p., 5 Tage
Milz	2,02	2,48	0,089
Leber	2,85	2,08	0,12
Niere	2,67	2,48	0,085
Muskel	0,74	< 0,5	0,008
Fett Niere	0,82	1,0	< 0,005
Herz	< 0,5	1,09	0,59
Lunge	3,70	1,81	0,020
Gehirn	< 0,5	< 0,5	
Lymphknoten Trachea	7,45	16,38	0,12
Lymphknoten Achsel	1,97	2,74	< 0,005
Lymphknoten Knie	7,83	3,8	< 0,005
Gehalt ($\mu\text{g/ml}$)			
Plasma	0,008	0,035	0,004
Galle	1,96	1,75	0,097

In den meisten untersuchten Gewebetypen lag nach 5 bis 10 Tagen der Inhibitor in einer Größenordnung von 1 bis 3 $\mu\text{g/g}$ vor. Die Plasmakonzentrationen des Inhibitors lagen 24 h nach der jeweils letzten i.p. Applikation jeweils ein bis zwei Größenordnungen unter den mittleren Gewebekonzen-

- 28 -

trationen. Daraus kann auf eine hohe Affinität für Gewebe und eine niedrige Plasmaeiweißbindung geschlossen werden. Die Konzentrationen des im Vergleich über 5 Tage applizierten Naphthylsulfonyl-Derivats waren in den verschiedenen Geweben 20-30 fach geringer.

5

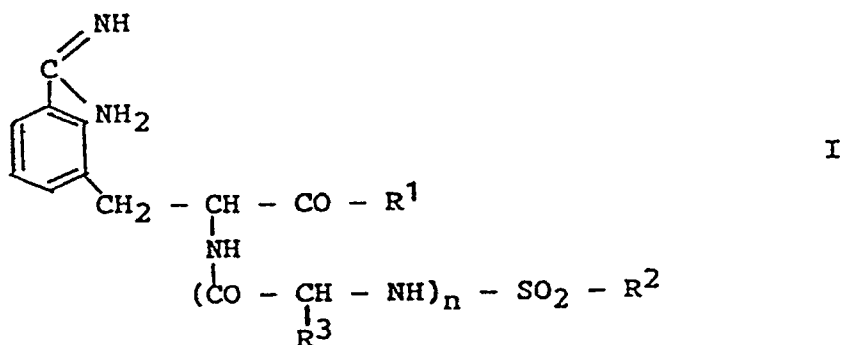
Der Inhibitor zeigt eine auffallende Anreicherung in den Lymphknoten. In den unabhängigen Versuchen wurden in trachealen Lymphknoten nach 5-tägiger Applikation Konzentrationen 5,3 bzw. 7,5 $\mu\text{g/g}$, nach 10-tägiger Applikation 21,6 bzw. 16,4 $\mu\text{g/g}$ gemessen. Da Tumorzellen sich regelmäßig
10 über lymphatische Bahnen disseminieren, ist die spezifische Anreicherung des Inhibitors in den Lymphgefäßen von Bedeutung und Vorteil für dessen Einsatz als anti-metastatisches Therapeutikum.

Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der Formel I

5

10



die als Racemate sowie als D- oder L-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

15

R1 (a) OH oder OR⁴ ist, wobei R⁴ ein gegebenenfalls substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₈-Alkyl, C₃-C₈-Cycloalkyl oder Aralkyl ist,

20

(b) eine Gruppe der Formel $\begin{array}{c} \text{R}^5 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{R}^6 \end{array}$ darstellt, in welcher R⁵

und R⁶ beliebige Reste sind, wobei insbesondere

25

- (i) R⁵ und R⁶ H sind,
- (ii) R⁵ H ist und R⁶ ein gegebenenfalls substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₈-Alkyl, Aralkyl, oder C₅-C₈ Cycloalkyl ist,
- (iii) R⁵ und R⁶ jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C₁-C₄ Alkyl sind oder
- (iv) R⁵ H ist und R⁶ -NH₂ oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,

30

- 30 -

- (v) R^5 H oder ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C_1 - C_4 Alkyl ist oder R^6 der Rest einer Aminosäure, eines Peptids oder eines Polypeptids ist,

5

- (c) eine Gruppe der Formel

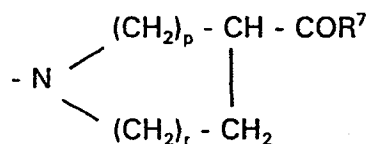


darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R^7 die Bedeutung von R^1 in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

15

- (d) eine Gruppe der Formel

20



25

darstellt, in welcher $p = r = 1$, $p = 1$ und $r = 2$ oder $p = 2$ und $r = 1$ sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, und R^7 die Bedeutung von R^1 in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist.

30

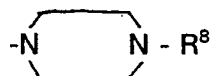
- (e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 substituiert ist,

- 31 -

wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

5

(f) eine Gruppe der Formel



10

darstellt, in welcher R^8

15

- (i) einen gegebenenfalls substituierten $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl- oder Arylrest,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkoxyrest oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,

20

- (g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X
 - (i) H, einen gegebenenfalls substituierten unverzweigten oder verzweigten Alkylrest,
 - (ii) einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, oder
 - (iii) einen gegebenenfalls substituierten Cycloalkylrest bedeutet,

25

- (h) einen Aralkylrest darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls substituiert ist,

30

- (i) einen Carbonsäureamidrest der Formel $\text{-CONR}'\text{R}''$, einen Thiocarbonsäureamidrest $\text{-CSNR}'\text{R}''$ oder einen Essigsäureamidrest $\text{-CH}_2\text{-CONR}'\text{R}''$ darstellt, wobei
 - (i) R' und R'' H sind,

- 32 -

- 5
- (ii) R' und R" jeweils unabhängig C₁-C₄-Alkyl sind,
 - (iii) R' H ist und R" C₁-C₄-Alkyl ist,
 - (iv) R' H ist und R" Aryl ist, oder
 - (v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom tragen kann, bilden,
- 10
- (j) einen SO₂-Y-Rest darstellt, in dem Y
 - (i) ein gegebenenfalls substituiertes C₁-C₈-Alkyl,
 - (ii) ein gegebenenfalls substituiertes Aryl oder Heteroaryl bzw. O-Aryl oder O-Heteroaryl, oder
 - (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C₁-C₃-Alkyl bedeuten,
- 15
- (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der gegebenenfalls substituiert ist,
- 20
- (l) einen gegebenenfalls substituierten Heteroarylrest oder heterocycloaliphatischen Rest darstellt,
- 25
- (m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel -(CH₂)_n-X darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist, n = 1 bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X
 - (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine C₁-C₄-Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, C₁-C₄-Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl (C₁-C₆), substituiert ist,
- 30
- (ii) ein Halogenatom bedeutet,
 - (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel -N(Alk)₂ darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-

- 33 -

Atome besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, S tragen kann, angehört,

5

R^2 einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

R^3 H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes C_1 - C_4 -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

10

oder von Salzen der Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten.

15

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 eine Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) ist, R^2 einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt, und $n=0$ ist.

20

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel I $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen ist.

25

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen in Form von physiologisch verträglichen Säuresalzen, insbesondere als Hydrochloride, vorliegen.

30

- 34 -

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Tumorbekämpfung.
6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Bekämpfung von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und der Metastasenbildung.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Bekämpfung von Pemphigus vulgaris.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindungen der Formel I als Konjugate mit weiteren pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindungen als Konjugate mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Substanzen eingesetzt werden.
10. Verwendung von Verbindungen der Formel II
$$X-R^2$$

worin
X einen beliebigen Rest darstellt und
R² einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,
oder von Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin R² ein 2,4,6-dreifach substituiertes Phenylrest, insbesondere 2,4,6-Triisopropyl ist.
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11 zur Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes.

- 35 -

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Bekämpfung von Lymphomen und der Metastasenbildung.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern.
16. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens eines Urokinaseinhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
17. Verfahren zum Targeting des Lymphgewebes bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 11.
18. $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantioner davon oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen.

Fig 1

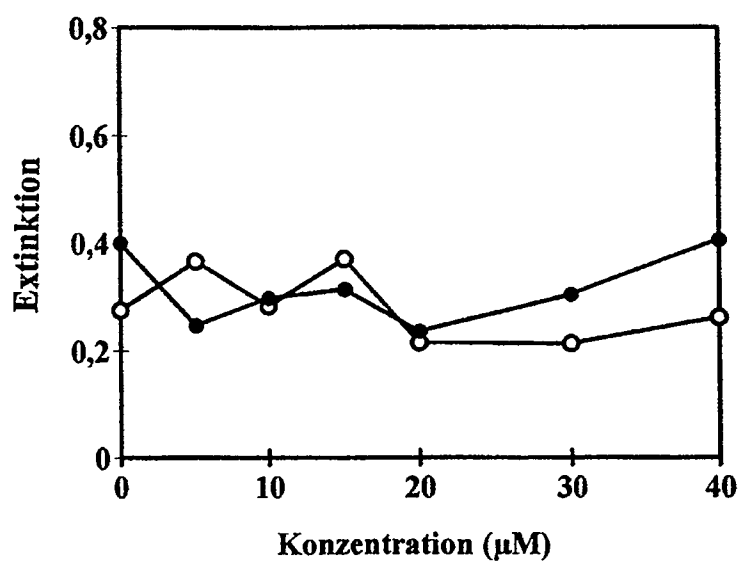
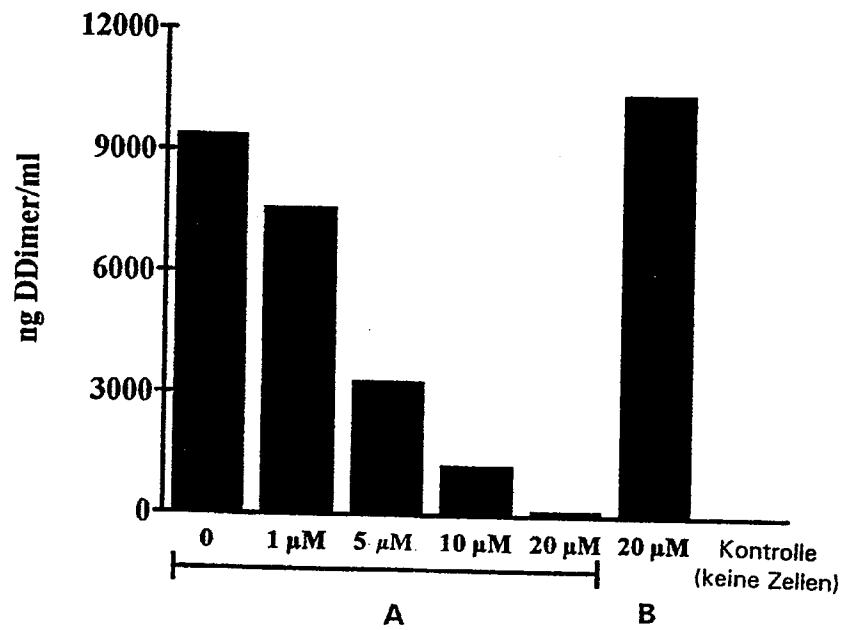


Fig 2



3/4

Fig 3

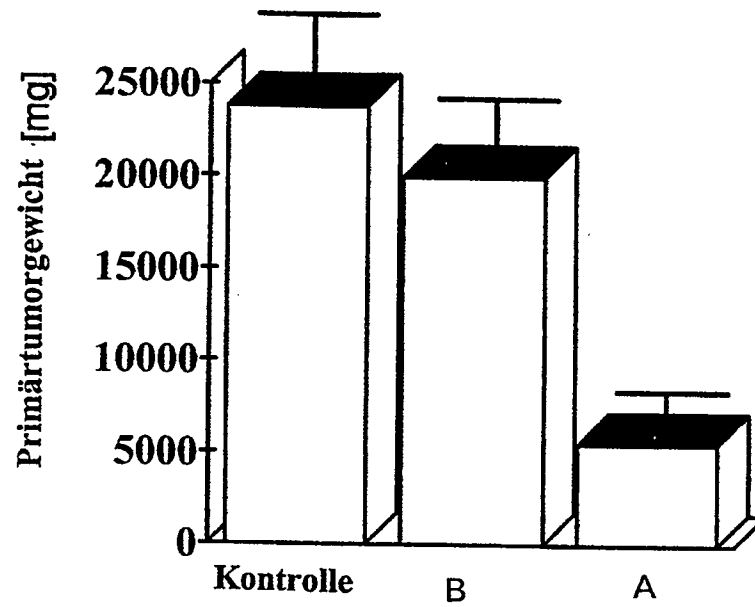


Fig 4

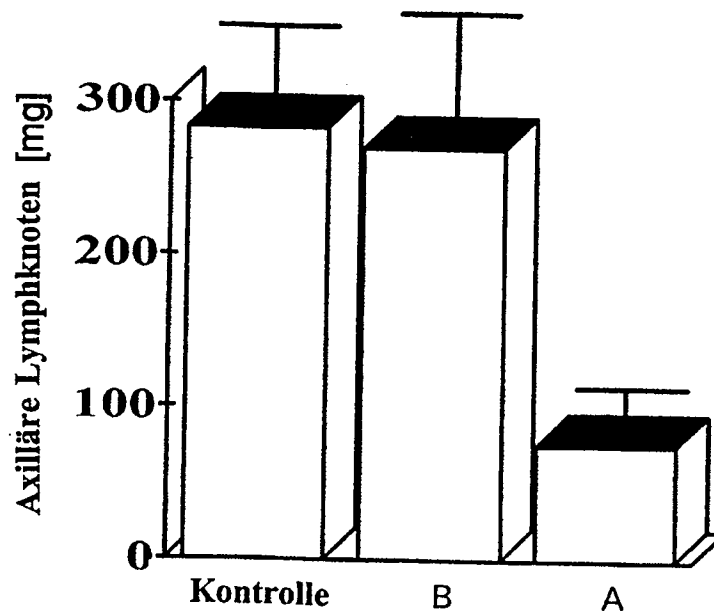


Fig 5

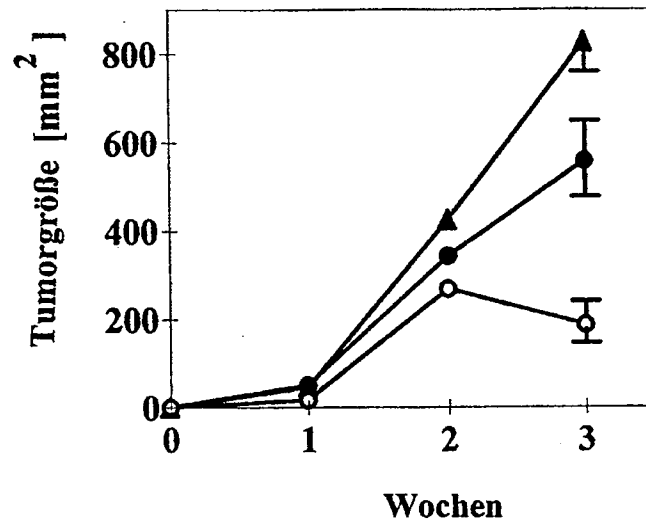
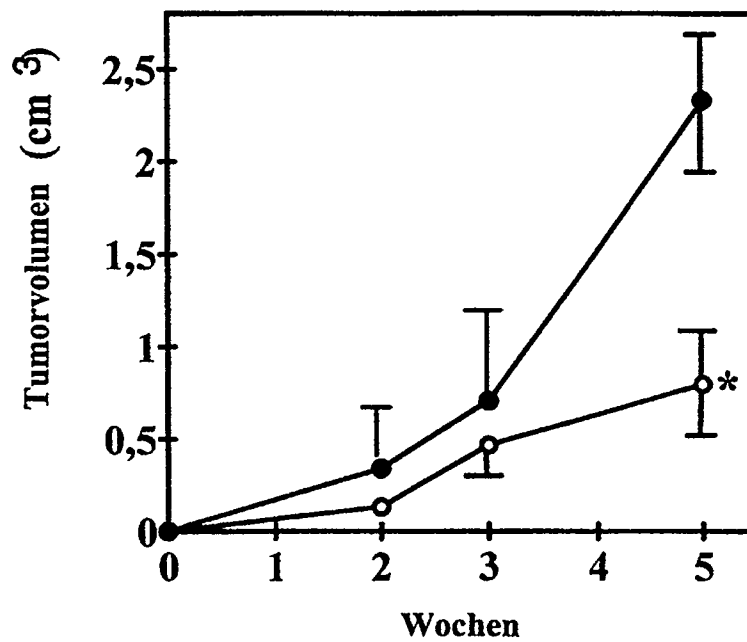


Fig 6



* p = 0,014